

A2

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 57-198096

(43)Date of publication of application : 04.12.1982

(51)Int.Cl.

C12P 7/42
C12R 1/225
C12R 1/365
C12R 1/37
C12R 1/38
C12R 1/465
C12R 1/77

(21)Application number : 56-084079

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 01.06.1981

(72)Inventor : HAMAGUCHI SHIGEKI
OGURA MASAHIRO
HASEGAWA JUNZO
KAWARADA HAJIME
WATANABE KIYOSHI

(54) PREPARATION OF D(-)-MANDELIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare the titled substance useful as a raw material of pharmaceuticals, etc., by treating benzoylformic acid with bacteria belonging to Lactobacillus genus, Leuconostoc genus, Streptococcus genus, Nocardia genus, etc. CONSTITUTION: Benzoylformic acid is treated with bacteria belonging to Lactobacillus genus, Leuconostoc genus, Streptococcus genus, Nocardia genus, Proteus genus, Fusarium genus, etc., e.g. Lactobacillus brevis, Leuconostoc m senteroides, Nocardia corallina, etc. The treatment is carried out by culturing said bacteria in a medium containing benzoylformic acid, or by reacting benzoylformic acid with the cultured liquid. The reaction is carried out at 3W9pH and 20W40° C to obtain D(-)-mandelic acid converted from benzoylformic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭57—198096

⑨ Int. Cl.³
C 12 P 7/42
C 12 R 1/225
1/365
1/37
1/38
1/465
1/77

識別記号

庁内整理番号
6760—4B

⑬ 公開 昭和57年(1982)12月4日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ D(一) —マンデル酸の製造方法

明石市大久保町高丘2丁目13—4

⑯ 特 願 昭56—84079

⑰ 発 明 者 川原田肇

⑱ 出 願 昭56(1981)6月1日

加古川市平岡町新在家2183の4

⑲ 発 明 者 濱口茂樹

⑰ 発 明 者 渡辺清

明石市大蔵谷字狩口143番地の7

明石市松ヶ丘5丁目15の41

⑲ 発 明 者 小倉正博

⑱ 出 願 人 鐘淵化学工業株式会社

小野市天神町1192—9

大阪市北区中之島3丁目2番4号

⑲ 発 明 者 長谷川淳三

⑳ 代 理 人 弁理士 浅野真一

明 細 書

1. 発明の名称 D(+)—マンデル酸の製造方法
2. 特許請求の範囲

(1) ベンゾイルギ酸に、このものをD(+)—マンデル酸に変換する能力を有するラクトバチルス属、ロイコノストック属、ストレプトコッカス属、ノカルディア属、プロテウス属、シュードモナス属、ヘリコステイルム属、シューデウロテイウム属、フザリウム属、シンセファラストルム属又はカニングハメラ属に属する微生物を作用せしめ、生成したD(+)マンデル酸を採取することを特徴とするD(+)マンデル酸の製造方法。

(2) 微生物がラクトバチルス・プレビス、ラクトバチルス・デルブリュツキー、ラクトバチルス・カゼイ、ロイコノストック・メセンテロイデス、ロイコノストック・デキストラニクム、ストレプトコッカス・クレモリス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ストレプトコッカス・ラクテイス、ストレプトコッ

カス・フエカーリス、ノカルディア・コラリーナ、プロテウス・ブルガリス、シュードモナス・クロロラフィス、シュードモナス・ダクンハエ、シュードモナス・リボフラビナ、シュードモナス・キサランチ、ヘリコステイルム・ニグリカンス、シューデウロテイウム・ムルティスポルム、フザリウム・メリスモイデス、シンセファラストルム・ニグリカンス又はカニングハメラ・エレガンスである特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(3) ベンゾイルギ酸を添加した培地で微生物を培養することにより微生物をベンゾイルギ酸に作用させる特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(4) 微生物を栄養培地で培養して得た培養液をベンゾイルギ酸に作用させる特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(5) 微生物を栄養培地で培養して得た培養液から微生物菌体を分離して、菌体懸濁液又は菌体処理物を調製し、それをベンゾイルギ酸に

作用させる特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

- (6) 微生物の培養及びベンゾイルギ酸との反応をpH 8.0～9.0の範囲で行なう特許請求の範囲第8項記載の製造方法。
- (7) 微生物の培養をpH 8.0～9.0の範囲で行ない培養液、菌体懸濁液或いは菌体処理物とベンゾイルギ酸との反応をpH 4.0～8.5の範囲で行なう特許請求の範囲第4項又は第5項記載の製造方法。
- (8) 微生物の培養及びベンゾイルギ酸との反応を20～40℃の範囲で行なう特許請求の範囲第8項、第4項又は第5項記載の製造方法。
3. 発明の詳細な説明

本発明は、ペニシリン系やセファロースポリン系抗生物質等の医薬品原料若しくは中間体として有用なD(-)-マンデル酸を微生物を利用して工業的に有利に製造する方法に関するものである。

従来、マンデル酸の光学活性体を得る方法として、エフェドリン、シンコニン等の光学分割剤を

用いる方法が知られている〔L. Gattermann and H. Wieland, "Die Praxis des Organischen Chemikers" 85 Aufl., 199, Walter de Gruyter (1958)〕。しかし、このような光学分割剤を用いる方法では、目的とする光学活性マンデル酸が最大50%の収率でしか得られず、また分割剤が高価である等、工業的方法として難点があつた。一方、合成法としては、ベンゾイルギ酸⁽¹⁾やベンゾイルギ酸エステル⁽²⁾から不斉還元反応により光学活性なマンデル酸を得る方法が知られている〔⁽¹⁾ D. Nasipuri and C. K. Ghosh; Journal of the Indian Chemical Society, 44(6), 556-8 (1967), ⁽²⁾ A. Ohno, M. Ikeguchi, T. Kimura and S. Oka; Journal of the American Chemical Society, 101, 7036-40 (1979)〕。しかし、これらの方法は光学純度或いは使用する不斉還元触媒のコストの点で問題がある。

本発明者らはかかる問題点を解決し、かつ工業的に有利に製造することを目的として鋭意研究を

重ねた結果、微生物を利用してベンゾイルギ酸から不斉還元反応によりD(-)-マンデル酸を高収率で、かつ高純度で得る方法を見出した。微生物を利用してベンゾイルギ酸からD(-)-マンデル酸を蓄積させたのは、これが最初である。

本発明は更に詳しくは、ベンゾイルギ酸に、CのものをD(-)-マンデル酸に変換しうる能力を有するラクトバチルス属、ロイコノストック属、ストレプトコッカス属、ノカルディア属、プロテウス属、シュードモナス属、ヘリコステイルム属、シュードエウロテウム属、フザリウム属、シンセファラストルム属又はカニングハメラ属に属する微生物を作用せしめ、生成したD(-)-マンデル酸を採取することを特徴とするD(-)-マンデル酸の製造法に関するものである。

本発明に使用されるベンゾイルギ酸からD(-)-マンデル酸へ変換する代謝系をもつ微生物としては、例えばラクトバチルス・ブレイビス (Lactobacillus brevis) IFO 8960, ラクトバチルス・デルブリュツキー (Lactobacillus

delbrueckii) IFO 8534, ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) IFO 12004, ロイコノストック・メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides) IFO 8426, ロイコノストック・デキストラニクム (Leuconostoc dextranicum) IFO 8347, ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris) IFO 8427, ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) IFO 3585, ストレプトコッカス・ラクテイス (Streptococcus lactis) IFO 12007, ストレプトコッカス・フェカリス (Streptococcus faecalis) IFO 12964, ノカルディア・コラリーナ (Nocardia corallina) IFO 8388, プロテウス・ブルガリス (Proteus vulgaris) IFO 8851, シュードモナス・クロロラフィス (Pseudomonas chlororaphis) IFO 8904, シュードモナス・ダクンハエ (Pseudomonas dacunhae) IFO 12048, シュードモナス・リボフラビナ

(*Pseudomonas riboflavina*) IFO 18584, シュードモナス・キサント (*Pseudomonas xanthae*) IAM 1810, ヘリコステイルム・ニグリカンス (*Helicostylum nigricans*) HUT 1106, シューデウロテイウム・マルチスポルム (*Pseudeurotium multisporum*) HUT 4088, フザリウム・メリスモイデス (*Fusarium merismoides*) IFO 80040, シンセファラストルム・ニグリカンス (*Syncephalastrum nigricans*) HUT 1299, カニングハメラ・エレガンス (*Cunninghamella elegans*) HUT 1098 が挙げられる。

但し IAM: 東京大学応用微生物研究所

IFO: 財団法人 発酵研究所

HUT: 広島大学工学部 醸酵工学教室

これら微生物の培養には、通常これらの菌が資化しうる有機及び無機の炭素源、窒素源及びビタミン、ミネラル等を適宜配合したものを用い、pH 8.0~9.0、温度20~40℃の範囲で1~7日間培養すれば良い。又、菌の種類によつては通気

攪拌し、微生物の生育を促進させることもできる。一方、反応基質であるベンゾイルギ酸との不斉還元反応においては、培養の開始時に培地中に反応基質を添加し、前記培養条件と同じpH、温度範囲で1~7日間、培養と並行して不斉還元反応を行なう方法と、培養とベンゾイルギ酸との反応を分けて行なう方法、即ち前記培養条件で培養して得られた培養液、菌体懸濁液、或いは菌体処理物と反応基質であるベンゾイルギ酸をpH 4.0~8.5、好ましくはpH 6.0~8.0の範囲、温度20~40℃の範囲で1~7日間接触させて不斉還元反応を行なう方法があるが、後者の方が良好な結果を与える。ここでいう菌体懸濁液とは、培養して得られた菌体と培養液を一旦遠心分離して分け、更めて菌体を培養液又は上記の栄養液に懸濁させたものであり、一方菌体処理物とは、培養して得られた菌体を遠心分離により培養液と分離し、この菌体を適当な方法により処理したもので、例えば公知の方法によりアクリルアミドゲル担体等に固定化する方法が挙げられる。菌体処理物を用いる利

点としては、ベンゾイルギ酸との反応を連続的に行なうことができる。

反応基質であるベンゾイルギ酸は反応液中での濃度は0.1%から10%程度の高濃度まで用いることができる。添加方法に関しては一括或いは分割添加どちらでも良い。

又、乳酸菌では、生成する乳酸によりpHが低下してくるので適当な中和剤で最適pHを保持するのが望ましい。又、好氣的反応条件下では通常副生成物が多くなるので、嫌気ないしは酸素の制限条件下で反応した方が良い収率を与える。不斉還元反応によつて生成したD(-)-マンデル酸を反応液から単離するには一般的な分離精製方法を用いれば良い。例えば、反応液から遠心分離によつて菌体等の不溶性物質を除去したのち、反応液のpHを1.0に調整し、酢酸エチルで抽出する。これを低温、減圧下にて溶剤を除くと、D(-)-マンデル酸の粗結晶物が得られ、更にこのものを少量のアセトンに溶解し、ヘキサノーアセトン混合溶剤で溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィ

ーを行なう事により容易に他の不純物と分離することができる。

以下、実施例によつて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

実施例1

下記の組成からなる栄養液体培地を調製し、三角フラスコに80mℓずつ分注後、120℃、15分殺菌した。

培地組成: グルコース2%, イーストエキス0.5%, ペプトン0.8%, 肉エキス0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, pH 7.0

これとは、別に同じ組成の培地にて前培養をした表1に示す微生物の種菌液10mℓを、前記培養培地に接種し、88℃、24時間静置培養を行なつた。

各菌株々々、90mℓ培養液に、10%ベンゾイルギ酸ソーダ溶液(pH 7.0)を10mℓ添加した。これを200mℓ4頭フラスコに入れ、窒素気流下、攪拌、pHを7.0に調整しながら80

表 1

ベンゾイルギ酸1g添加

菌 株	マンデル酸 収量 (mg)	$[\alpha]_D^{25}$ (C, 1.0, エタノール)
ラクトバチルス・プレビス IFO 8960	734	-138.2°
ラクトバチルス・デルブリュツキー IFO 8634	74	-129.2°
ラクトバチルス・カゼイ IFO 12004	148	-181.4°
ロイコノストック・メセンテロイデス IFO 8426	551	-142.3°
ロイコノストック・デキストラニクム IFO 3347	890	-149.5°
ストレプトコッカス・グレモリス IFO 8427	359	-134.7°
ストレプトコッカス・サーモフィルス IFO 3535	528	-136.5°
ストレプトコッカス・ラクティス IFO 12007	257	-132.8°
ストレプトコッカス・フェカリス IFO 12964	862	-146.2°

℃で48時間反応させた。反応後、遠心分離して得た上清を硫酸でpH 1.0とし、酢酸エチル200mlで抽出した。減圧濃縮後、これをヘキサンで懸濁調製したシリカゲルカラムに負荷し、ヘキサン/アセトン(3:1)混液で溶出した。マンデル酸画分を集め、減圧下溶剤を除去すると無色のマンデル酸結晶が得られた。

NMRスペクトル、IRスペクトル、マスマスペクトル及びシリカゲル薄層クロマトグラフィー(ベンゼン:アセトン=2:8)によるRf値は標準品と一致した。又、その旋光度を測定したところ、いずれも $[\alpha]_D^{25} = -129.2^\circ \sim -149.5^\circ$ (C, 1.0, エタノール)の範囲を示しD(-)-マンデル酸であることが確認された。

実施例2

下記の組成からなる栄養液体培地を調製し、2ℓ坂口フラスコに80mlずつ分注後、120℃、15分殺菌した。

培地組成: グルコース2%、イーストエキス0.5

%、ペプトン0.8%、肉エキス0.8%、 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0.2%、 KH_2PO_4 0.1%、pH 7.0

これとは別に同じ組成の培地にて前培養をした表2に示す、微生物の種菌液10mlを、前記培養培地に接種し、80℃、24時間振とう培養を行なった。各菌株夫々90ml培養液に、1.0%ベンゾイルギ酸ソーダ溶液(pH 7.0)を10ml添加した。これを200ml 4頭フラスコに入れ、窒素気流下、攪拌、pHを7.0に調整しながら80℃で48時間反応させた。以下、実施例1と同様の操作で抽出精製を行ない、マンデル酸結晶を得た。これらのNMRスペクトル、IRスペクトル、マスマスペクトル及びシリカゲル薄層クロマトグラフィー(ベンゼン:アセトン=2:8)によるRf値は標準品と一致した。又、その旋光度を測定したところ、いずれも $[\alpha]_D^{25} = -125.1^\circ \sim -142.6^\circ$ (C, 1.0, エタノール)の範囲を示し、D(-)-マンデル酸であることが確認された。

表 2

ベンゾイルギ酸1g添加

菌 株	マンデル酸 収量 (mg)	$[\alpha]_D^{25}$ (C, 1.0, エタノール)
ノカルディア・コラリーナ IFO 3338	159	-136.8°
プロテウス・ブルガリス IFO 3851	42	-127.4°
シュードモナス・クロロラフィス IFO 3904	245	-125.1°
シュードモナス・ダクンハエ IFO 12048	278	-137.1°
シュードモナス・リボフラビナ IFO 13584	219	-132.8°
シュードモナス・キサンチ IAM 1810	64	-141.2°
ヘリコステイルム・ニグリカンス HUT 1106	120	-126.4°
シューデクロテイウム・ムルティスポルム HUT 4038	118	-133.9°
フザリウム・メリスモイデス IFO 30040	74	-137.5°
シンセファラストルム・ニグリカンス HUT 1299	68	-142.6°
カニングハメラ・エレガンス HUT 1098	79	-139.0°

実施例 3

下記の組成からなる栄養液体培地を調製し、三角フラスコに8.0mℓずつ分注後、120℃、15分殺菌した。

培地組成：グルコース2%、イーストエキス0.5%、ペプトン0.8%、肉エキス0.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0.2%、 KH_2PO_4 0.1%、pH 7.0

これとは別に同じ組成の培地にて前培養をした表3に示す微生物の種菌液10mℓを、前記培養培地に接種し、更に10%ベンゾイルギ酸ソーダ溶液(pH 7.0)を10mℓ添加した。これを200mℓ4頭フラスコに入れ、窒素気流下、攪拌、pHを7.0に調整しながら80℃で72時間反応させた。以下、実施例1と同様の操作で抽出精製を行ないマンデル酸結晶を得た。これらのNMRスペクトル、IRスペクトル、マススペクトル及びシリカゲル薄層クロマトグラフィー(ベンゼン：アセトン=2：8)によるRf値は、標準品と一致した。又、その旋光度を測定したところ、いずれも $[\alpha]_D^{25} = -144.2^\circ \sim -147.5^\circ$

(C, 1.0, エタノール)の範囲を示し、D(-)-マンデル酸であることが確認された。

表 3

1gベンゾイルギ酸添加

菌 株	マンデル酸 収量(mg)	$[\alpha]_D^{25}$ (C, 1.0, エタノール)
ロイコノストク・デキストラニクム IFO 8847	584	-147.5°
ストレプトコッカス・フェカーリス IFO 12964	559	-144.2°

実施例 4

下記の組成からなる栄養液体培地を調整し、三角フラスコに500mℓずつ分注後、120℃、15分殺菌した。

培地組成：グルコース2%、イーストエキス0.5%、ペプトン0.8%、肉エキス0.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0.2%、 KH_2PO_4 0.1%、pH 7.0

これとは別に同じ組成の培地にて前培養をした表4に示す微生物の種菌液10mℓを、前記培養培地に接種し、83℃、24時間静置培養を行な

い、得られた培養液を遠心分離により菌体を集め、更にこの培養上清液にて懸濁し80mℓとした。これに10%ベンゾイルギ酸ソーダ(pH 7.0)溶液20mℓを添加した。これを200mℓ4頭フラスコに入れ、窒素気流下、攪拌、pHを7.0に調整しながら80℃で48時間反応させた。以下、実施例1と同様の操作で抽出精製を行ないマンデル酸結晶を得た。これらのNMRスペクトル、IRスペクトル、マススペクトル及びシリカゲル薄層クロマトグラフィー(ベンゼン：アセトン=2：8)によるRf値は標準品と一致した。又、その旋光度を測定したところ、いずれも $[\alpha]_D^{25} = -144.8^\circ \sim -146.7^\circ$ (C, 1.0, エタノール)の範囲を示し、D(-)-マンデル酸であることが確認された。

表 4

2gベンゾイルギ酸添加

菌 株	マンデル酸 収量(mg)	$[\alpha]_D^{25}$ (C, 1.0, エタノール)
ロイコノストク・デキストラニクム IFO 8847	1707	-146.7°
ストレプトコッカス・フェカーリス IFO 12964	1640	-144.8°